

ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ
ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ ПРИ МСХ СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ
В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

Часть XI

Москва - 1981

Государственная комиссия по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ
В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

Часть XI-я

Данные методики апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР

Москва - 1981

Настоящие методические указания предназначены для санитарно-эпидемиологических станций и научно-исследовательских учреждений Минздрава СССР, а также ветеринарных, аграрохимических, контрольно-токсикологических лабораторий Минсельхоза СССР и лабораторий других Министерств и ведомств, занимающихся анализом остаточных количеств пестицидов и биопрепаратов в продуктах питания, кормах и внешней среде.

Методические указания апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР. (Председатель группы экспертов И.А.Клисенко).

Методические указания согласованы и одобрены отделом перспективного планирования санэпидслужбы ИМПиТМ им. Е.И.Марциновского и лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР.

"УТВЕРДЛЮ"

Заместитель Главного
Государственного санитарного
врача СССР А.И.Зайченко

28 января 1980г. № 2128-80

Методические указания по определению
полиэдров вируса ядерного полиэдроза
капустной совки на растительных объектах
иммунофлюоресцентным методом

Настоящие методические указания распространяются на определение содержания полиэдров инсектицида вирин-ЭКС на растительных объектах при санитарном контроле, а также для научно-исследовательской работы.

I. Характеристика анализируемого инсектицида

I.1. Вирин-ЭКС - вирусный аттомопатогенный препарат - вирусный инсектицид. Предназначается для борьбы с гусеницами капустной совки на капусте, сахарной свекле и других сельскохозяйственных культурах. Действующим началом препарата является вирус ядерного полиэдроза, относящийся к группе бакуловирусов. В препарате вирус находится в виде вирионов, заключенных в полиэдры / многогранники/, представляющие собой кристаллизованный кремнезем содержащий фелок. Внутри каждого полиэдра заключено 10-20 вирионов. Размеры полиэдров 0,5-5 мк.

Препарат представляет собой суспензию полиэдров в 50% глицерине.

Препарат содержит не менее 1×10^9 полиэдров в мл. Применяется путем опрыскивания сельскохозяйственных культур, поврежденных капустной совкой. Обработку проводят любым опрыскивателем против гусениц всех возрастов. Расход препарата - 100 мл/га. Перед опрыскиванием

в рабочую суспензию добавляют поверхность активное вещество ОП-7 в конечной концентрации 0,006 - 0,04%.

I.2. Физические и химические свойства.

Вирин-ЭКС - суспензия серого цвета в 50% глицерине. Влажность - 96-98%, pH 6,8-7. Выпускается в жидкой форме или в порошковой форме с наполнителем глиной и титром 1×10^9 полиздротов/гр.

I.3. Токсикологическая характеристика.

Медико-токсикологические исследования, проведенные в КНИИЭМи, показали, что действующее начало препарата - вирус ядерного полиздроза - при введении в организм экспериментальных животных всеми известными путями не репродуцируется и не вызывает скрытой или явной инфекции.

Вирус не репродуцируется в культурах клеток позвоночных. Препарат и его активное начало не могут вызывать инфекционное заражение людей, домашних или диких животных.

Препартивные формы инсектицидов /сухие и жидкие/ не токсичны для человека и теплокровных животных при однократном и множественном воздействии различными путями. В связи низкой токсичностью LD₅₀ для крыс и мышей не определяется. Токсическая доза для куриного эмбриона - $0,5 \times 10^8$ полиздротов на эмбрион. В эксперименте показано, что вирин-ЭКС является слабым аллергеном, может оказывать иммунологическое аллергизирующее действие, как и другие белоксодержащие продукты микробного происхождения. Рекомендована ПДК в воде рыбоводческих хозяйственных водоемов 1 мг/л / Прокопенко В.А., 1978 /.

2. Методика определения полиздротов вирин-ЭКС на растительных объектах иммунофлуоресцентным методом

2.1. Основные положения

Метод определения остаточных количеств вирин-ЭКС во внешней среде является модификацией известного метода Кунса /1941/, приме-

ияяного в медицинской вирусологии. Используется непрямой вариант метода Кунса. Определение остаточных количеств препарата во внешней среде проводится не по вирионам, а по полиздрам в связи с тем, что вирусные частицы весьма лабильны и легко разрушаются во внешней среде под влиянием различных факторов.

При условии централизованного изготовления иммунных антиполиадренальных сывороток иммунофлюоресцентный метод является экспресс-методом, высокочувствительным и специфичным.

2.1.1. Принцип метода.

В основе метода лежит специфическая реакция взаимодействия антигена /в данном случае полиздров/ с антителами, меченными флуоресцирующим красителем /ФИТЦ/. Реакция выявляется в виде специфического свечения при наблюдении в люминесцентном микроскопе – ярко-зеленое свечение ободка полиздров.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода.

Данным методом можно определить количество полиздров в диапазоне от $0,5 \times 10^2$ до 1×10^{11} полиздров в 1 мл.

2.1.3. Избирательность метода.

Метод высокочувствительный и специфичный. Способен дифференцировать различные виды полиздров. Чувствительность метода в большой степени зависит от качества приготовленных гипериммунных сывороток.

2.2. Реактивы и материалы.

Для проведения анализа необходимы реактивы, которые обычно имеются в вирусологической лаборатории, где ведутся исследования с люминесцентным микроскопом. К ним относятся:

- 1) ацетон
- 2) физиологический раствор /рН 7,1-7,2/
- 3) спирт этиловый
- 4) нефторесцирующее иммерсионное масло

5) сахароза

6) антибиотики: пенициллин, стрептомицин, нистатин

7) мертиолят

Специфическими ингредиентами в данной методике являются:

а) синька Эванса, б) меченая изотиоционатом флюресцеина осмоляная сыворотка против глобулинов кролика /изготавляемая в г.Москва в Институте эпидемиологии и микробиологии им.Гамалеи/ в) специфическая антиполиэдреная крольчья сыворотка.

Поскольку централизованное производство антиполиэдренных сывороток еще не наложено, необходимо изготавливать сыворотки в лабораторных условиях. Схема иммунизации кроликов полиэдрами описана нами в сборнике № 10 "Методических указаний по определению микрокаличеств пестицидов в продуктах питания, корках и внешней среде" на примере вирин-ЭНШ и может быть применена для получения антиполиэдренной сыворотки к вирусу ядерного полиэдроза капустной совки.

Материалом для иммунизации служит взвесь очищенных полиэдров капустной совки, извлеченных из препарата методом дифференциального центрифугирования и разделения в градиенте плотности сахарозы, как описано на примере вирин-ЭНШ в сборнике № 10.

2.3. Приборы, аппаратура, посуда.

1) люминесцентный микроскоп 10) пробирки бактериологич.

2) окулярная сетка 11) чашки Петри

3) объект-микрометр 12) предметные стекла

4) камера Горяева 13) пипетки пастеровские

5) центрифуга / до 5000 об/мин / 14) пипетки мерные

6) термостат / 37⁰С / 15) цилиндры стеклянные.

7) pH-метр

8) мембранные фильтры № 2,3

9) фильтр Зейтца

2.4. Подготовка к определению.

При отсутствии централизованного изготовления специфических иммунных антиполиэдрических сывороток основная подготовительная работа сводится к приготовлению этих сывороток в лабораторных условиях.

Следующим подготовительным этапом является отбор проб, их подготовка и хранение. Описание приводится в пункте 2.5.

Накануне исследования следует отмытировать микроскоп, установить фильтры.

Для проведения подсчета полиэдров в исследуемом объеме по формуле, приводимой в пункте 2.7, необходимо определить площадь квадрата окулярной сетки \mathcal{S} с помощью объект-микрометра, помещенного на предметный столик микроскопа вместо препарата. Определяют сторону квадрата окулярной сетки. При отсутствии окулярной сетки определяют с помощью объект-микрометра диаметр поля зрения и вычисляют \mathcal{S} по формуле: $\mathcal{S} = \pi R^2$.

2.5. Отбор проб.

После обработки сельскохозяйственных культур вирусными инсектицидами вирионы и полиэдры не проникают внутрь растений. Они могут находиться только на поверхности растительных объектов.

Для взятия проб с поверхности растительных объектов / листья, плоды/ нужно заготовить заранее марлевые салфетки 5x5 см. Уложить их в чашки Петри или бумажные пакеты и простерилизовать; в таком виде они могут долго храниться. С помощью таких салфеток можно брать пробы методом смыва / протирания / влажной салфеткой более или менее гладкой поверхности растения / головки капусты, листьев капусты, свеклы / порядка 100 см². Для этого пинцетом берут салфетку, смачивают в стерильном физиологическом растворе /рН 7,4-7,6/, избыток отжимают и тщательно протирают исследуемую площадь. Затем

салфетку переносят в колбочку с физиологическим раствором / 100мл/. Энергично встряхивают 3-5 минут, салфетку отжимают пинцетом и удаляют.

При исследовании неровных поверхностей / ягоды, плоды/ или поверхностей мелких объектов /трава/ делают нарезки исследуемых объектов, заполняют ими трафарет с площадью 100 см². Общая площадь нарезки будет равняться 100 см². Затем измельченные нарезки помещают в колбы с физиологическим раствором /рН 7,4-7,6/ и ставят на магнитную мешалку на 10-15 минут.

Пробы фильтруют через три слоя марли для удаления грубых частиц, а затем пропускают через фильтр Зейтца с мембранными пластинками №2 или №3 с помощью вакуумного насоса. По окончании фильтрации фильтр подсушивают на фильтровальной бумаге при +40°C. Пробы собирают в количестве не меньше 6 в различных точках исследуемого участка в зависимости от целей исследований.

2.6. Проведение определения.

Исследования подвергаются мембранные фильтры, через которые были пропущены полученные пробы /смывы с растительных объектов/.

Фильтр переносят на обезжиренное предметное стекло лицевой стороной /осадком/ кверху. Стекло с фильтром помещают в чашку Петри на две стеклянные палочки. На фильтр пипеткой осторожно наливают ацетон. Фильтр обесцвечивается, и препарат фиксируется к стеклу. Препарат подсушивают до полного испарения ацетона /образовавшаяся пленка должна быть прозрачна/. Для устранения неспецифического свечения препарат обрабатывают синькои Эванса, водный раствор которой в разведении 1:10000 наносят на препарат. Время обработки зависит от типа пробы и составляет от 1 до 15 минут. Препарат промывают в проточной воде, подсушивают на воздухе. Препарат должен иметь слабо-

голубую окраску. На высушенный препарат наносят иммунную кроличью сыворотку против полиэдров капустной совки, предварительно разведенную 1:10 физиологическим раствором. Помещают в термостат во влажной камере /чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне/ при 37⁰С на 15-20 минут. Затем сыворотку смывают проточной водой 2 минуты, препарат подсушивают на воздухе, после чего на препарат наносят ослинную антикроличью меченую ФИТЦ сыворотку в рабочем разведении, указанном на ампуле. Снова выдерживают в термостате при 37⁰С 15-20 минут с последующим промыванием в проточной воде.

После подсушивания препарат готов к просмотру. Просмотр можно проводить в любом люминесцентном микроскопе, а также в обычном световом с применением опак-иллюминатора и люминесцентной установки ОИ-17, ОИ-18. Изложенный метод окраски позволяет выявить даже единичные полиэдры по их специфическому свечению. Ободок полиэдров имеет ярко-зеленое свечение на общем красноватом фоне препарата.

Контролем служат: а) препараты, приготовленные по той же схеме, но без обработки специфической сывороткой; б) препараты, приготовленные из проб, взятых на необработанных участках. Контрольные препараты специфического свечения не имеют.

2.7. Обработка результатов анализа.

Предлагаемый метод позволяет сделать качественное, а также количественное заключение о загрязненности вирусными инсектицидами растительных объектов. Для количественного анализа производят подсчет полиэдров на фильтрах по формуле: $M = \frac{a \cdot S \cdot 10^6}{S \cdot V}$, где

M - число полиэдров в объеме исходной суспензии;

a - среднее число полиэдров в одном квадрате окулярной сетки;

S - площадь квадрата окулярной сетки в мм^2 /площадь поля зрения/;

$S \cdot 10^6$ - площадь мембранныго фильтра в мм^2 /переводной коэффициент 276.

в $\text{мм}^2 \cdot 10^6 /$

V - объем профильтрованной суспензии.

Для более точного подсчета числа полиздротов в квадрате окулярной сетки проводят подсчет по 32 квадратам на 3 различных участках фильтра при общем числе подсчитанных полиздротов не меньше 600. Затем вычисляем среднее арифметическое значение a . Определение площади квадрата окулярной сетки описано в пункте 2.4.

Пример: число полиздротов в 32 квадратах при первом подсчете составило 420, при втором - 395, при третьем - 427. Вычисляем:

$$a = \frac{(420+395+427)}{32 \times 3} = 13$$

$S = 0,041 \text{ м}^2$ - площадь поля зрения /определены по объект-микрометру/

$$S_1 = \pi R^2 = 3,14 \times 17,5^2 = 961,6$$

$$V = 500 \text{ мл}$$

$$M = \frac{13 \times 961,6 \times 10^6}{0,041 \times 500} = \frac{125008 \times 10^6}{20,5} = 6,1 \times 10^6 \text{ полиздротов на 1 мл}$$

3. Требования безопасности.

Поскольку препарат вирин-ЭКС не токсичен и не инфекционен для человека в рекомендуемых нормах, то при работе по санитарно-гигиеническому контролю соблюдаются меры безопасности такие, как при работе с мало токсичными веществами. При работе с препаратом необходимо иметь индивидуальные средства для защиты органов дыхания - респиратор "лепесток" ШБ-1. Для защиты рук необходимы резиновые перчатки ГОСТ 9502-60.

К работе с препаратом не допускаются лица со склонностью к аллергическим засолеваниям. По окончании работы рекомендуется прополоскать полость рта содовым раствором. Лица, контактирующие с препаратом, периодически подвергаются осмотру - 1 раз в 12 месяцев.

/ Приказ Минздрава ССР от 30 мая 1969 г., № 400 /

4. Литература:

1. Гулий В.В., Голосова Н.А. Вирусы в защите леса от вредных насекомых. М., "Лесная промышленность", 1975.
2. Сидоренко Г.И. Методы санитарно-микробиологического исследования объектов окружающей среды. М., "Медицина", 1978.

Исполнители: Киевский НИИ эпидемиологии, микробиологии и паразитологии МЗ УССР / Трусов В.И., Васильева В.Д./

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Хлорсодержание пестициды

1. Методические указания по определению нафрана в меде методом газовой хроматографии	I
2. Методические указания по определению нитрохлора и префорана в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газожидкостной хроматографии	8
3. Методические указания по определению ЭФ-2 в воде и почве газожидкостной хроматографией	14
4. Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях хроматографией в тонком слое . .	22
5. Методические указания по определению полихлорированных бифенилов в присутствии хлорорганических пестицидов в птицепродуктах методом газовой хроматографии	45

Фосфорсодержание пестициды

1. Методические указания по определению остаточных количеств волексона в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией .	52
2. Методические указания по определению остаточных количеств гетерофоса в овощных культурах, почве и воздухе методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии	61
3. Методические указания по определению остаточных количеств дурсбиона в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией .	67
4. Методические указания по определению остаточных количеств изофоса-3 в рисе, почве и воде газожидкостной и тонкослойной хроматографией	75
5. Методические указания по определению метилнитрофоса и фенитрооксона в зерне и продуктах переработки зерна хромато-энзимным и газохроматографическим методом	84

6. Методические указания по определению остаточных количеств рицида "Н" в рисе и воде газожидкостной хроматографией	93
7. Методические указания по определению метилнитрофоса, фениндроксона и п-нитрокреазола в зерне и продуктах переработки зерна методом хроматографии в тонком слое	103
8. Энзимно-хроматографический метод определения фосфорорганических пестицидов в растительных продуктах и биосубстратах	109

Азотсодержащие пестициды

1. Производные мочевины, гуанидина, дитиокарбаминовой кислоты, анилиды карбоновых кислот, нитропроизводные, дитиокарбаматы	
1. Методические указания по определению дуала в растительном материале, почве и воде хроматографией в тонком слое	118
2. Методические указания по определению остаточных количеств гербицида малорена в почвах с различным содержанием гумуса методом ТСХ	124
3. Методические указания по определению остаточных количеств НЕ-166 в огурцах хроматографией в тонком слое и фотометрическим методом	129
4. Методические указания по определению остаточных количеств тенекса в воде и почве	136
5. Методические указания по определению ФДН (N,N' -диметил- N -(3-хлорфенил)-гуанидин) в огурцах и воде методом тонкослойной хроматографии	139
6. Методические указания по определению дитана М-45 в продуктах питания растительного происхождения и воде	149
П. Гетероциклические соединения	
7. Методические указания по определению базаграна в воде, почве, зерне и растительном материале	152

8. Методические указания по определению фунгицида бай- летона методом ТСХ в почве, корнях, зеленых листьях, плодах томатов и огурцов	159
9. Методические указания по газожидкостно-хроматогра- фическому определению бентазона в почве и растениях	166
10. Методические указания по определению диквата в се- менах подсолнечника и масле из семян подсолнечника спектрофотометрическим методом	174
II. Методические указания по определению метазина в во- де, почве, овоцах и биологическом материале методом хроматографии в тонком слое сорбента	181
12. Методические указания по определению остаточных ко- личеств сим-триазиновых гербицидов (симазина, эт- разина, пропазина, прометрина, семерона, мезорани- ла, метазина, метопротрина) в почве газожидкостной хроматографией	188
13. Методические указания по определению котофора в се- менах хлопчатника методом хроматографии в тонком слое	198
14. Методические указания по определению ронстара (ок- сидазона) в рисе методами газовой и тонкослойной хроматографии	205
15. Методические указания по определению тачигарена в воде методом тонкослойной хроматографии	209
16. Методические указания по определению тербацила в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газо- жидкостной хроматографии	214
17. Методические указания по определению трифорина в воде	220
18. Методические указания по определению остаточных ко- личеств текто(тиабендазола) в картофеле и свекле тонкослойной хроматографией	227
19. Методические указания по определению остаточных ко- личеств фоназона в почве, воде, свекле и раститель- ных объектах газожидкостной хроматографией	234

Прочие пестициды

1. Методические указания по определению остаточных количеств хлората магния полярографическим методом ...	243
2. Методические указания по определению нитрона в воде, черноземной почве и сахарной свекле	248
3. Методические указания по определению содержания общей ртути в мясе, яйцах, рыбе, молочных продуктах, почве	255

Бактериальные пестициды

1. Методические указания по определению микробиологических инсектицидов не прямым иммунофлюоресцентным методом	268
2. Методические указания по определению витамина А в воздухе методом тонкослойной хроматографии	276
3. Методические указания по определению полиэдров ви-руса ядерного полиэдроза капустной совки на растительных объектах иммунофлюоресцентным методом	280

Дополнения

1. Хроматографическое определение микроколичеств грапанида, линурона, монолинуриона и их метаболов в воде, почве и растительном материале	289
2. Методические указания по определению актеллика растительной продукции, почве и воде	296